

#2

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 OCT. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 17 / 010201

REMISE EN DÉPÔT DATE 02 OCT 2002 LEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 8 OCT. 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv539/109FR		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) VECTEURS ADENOVIRAUX RECOMBINANTS ET LEURS APPLICATIONS.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) Etablissement public 147, rue de l'Université 75 007 PARIS FRANCE Française N° de télécopie (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

8 OCT 2002

Réservé à l'INPI

REMISE DES FICHERS

DATE

LIEU

0212472

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 47 / 010001

Vos références pour ce dossier : (facultatif)		MJPbv539/109FR
MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		VIALLE-PRESLES
Prénom		Marie José
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	6, avenue de Messine
	Code postal et ville	17 5 0 0 8 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01.45.62.75.00
N° de télécopie (facultatif)		01.45.62.04.86
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
INVENTEUR(S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)
RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», Indiquez le nombre de pages jointes		1
SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 8 octobre 2002 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. TRAN



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



REMISE EN DÉPÔT DATE 02 OCT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0212472 NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI		Réserve à l'INPI Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire	
Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv539/109FR	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT (ENVA)	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	7, avenue du Général de Gaulle	
	Code postal et ville	19 4 7 0 4 MAISONS-ALFORT Cedex	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 8 octobre 2002 VIALLE-PRESLES Marie José	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. TRAN	

La présente invention est relative à de nouveaux adénovirus recombinants, et à leur procédé de préparation, ainsi qu'à leurs utilisations comme vecteurs d'expression et de transfert de gène, à des fins vaccinales ou à des fins thérapeutiques comme le traitement du cancer.

Les adénovirus sont des virus nus possédant un génome linéaire à ADN double brin d'environ 30-40 kpb, flanqué de courtes séquences inversées répétées (ITR).

Le génome de l'adénovirus est organisé en unités de transcription précoce (E1 à E4) et en une unité tardive (MLTU) composée de cinq familles de transcrits (L1 à L5) dont l'expression est séparée par l'initiation de la réplication de l'ADN viral.

La phase précoce débute deux heures après l'infection par la transcription et l'expression séquentielle des régions E1A puis E4, presque simultanément E3 et E1B, puis E2A et enfin E2B. La région immédiatement précoce E1A code des transactivateurs des autres gènes précoces de l'adénovirus (E1B, E2, E3 et E4) ainsi que de gènes cellulaires. Huit heures après l'infection, la réplication de l'ADN viral débute. La phase tardive qui commence douze heures après l'infection est caractérisée par l'extinction de la synthèse des protéines cellulaires au profit des protéines virales tardives qui entrent dans la composition structurale de la particule adénovirale, et participent à l'assemblage du virion et à sa libération en affectant l'intégrité structurale de la cellule infectée.

Les adénovirus présentent un attrait particulier pour le développement de vecteurs viraux, du fait de leurs caractéristiques et de la quantité de connaissances disponibles sur leur organisation génétique et leur biologie.

Différentes stratégies de construction ont été envisagées selon que l'objectif est d'obtenir un virus réplcatif, capable de se multiplier chez l'hôte permissif (humain ou animal), ou un virus non-réplcatif incapable de se multiplier chez l'hôte.

La construction d'un vecteur non-réplcatif implique de déléter une région essentielle à la réplication

virale. Les virus résultants, qui sont incapables de se répliquer et par conséquent de produire des particules infectieuses dans des cellules permissives à l'infection par le virus sauvage correspondant, sont produits dans des lignées cellulaires modifiées capables de fournir en trans le produit des gènes délétés.

Une stratégie couramment utilisée consiste à insérer un gène hétérologue dans la partie gauche du génome entre l'ITR gauche et la région E1, en lieu et place du promoteur et de la région codante du gène E1A (délétion partielle de E1) et éventuellement du gène E1B (délétion totale de la région E1). Les virus délétés pour E1A sont incapables de se répliquer dans les cellules qui ne complètent pas les fonctions de E1A. Ils sont cependant capables d'exprimer des quantités importantes de protéine exogène dans les cellules infectées.

De nombreux vecteurs adénoviraux humains (Ad2 et Ad5) délétés de la région E1 et éventuellement de la région E3 ont été construits, essentiellement à des fins de thérapie génique humaine. Afin d'améliorer ces vecteurs, des mutations (région E2) ou des délétions supplémentaires (région E2 ou E4) ont été introduites.

Des vecteurs adénoviraux non-réplicatifs canins délétés de la totalité de la région E1 ont également été développés pour des applications de thérapie génique humaine [KLONJKOWSKI et al., Human Gene Therapy, 8, 2103-2115, 1997, délétion des positions 411 à 2897 de Cav2 ; Demande WO 95/14101 et Brevet US 5837531 au nom de RHONE POULENC RORER ; KREMER et al., J. Virol., 74, 505-512, 2000, délétion des positions 412 à 2897 de Cav2).

Ces vecteurs non réplicatifs ont montré une bonne efficacité de transfert de gènes dans de nombreux tissus. Ils présentent cependant un certain nombre d'inconvénients, en particulier pour le transfert de gènes dans des cellules en division active comme les cellules tumorales. Dans ces cellules, on observe une extinction rapide de l'expression du gène transféré liée à la perte du vecteur extrachromosomique au cours des divisions successives.

La construction d'un vecteur réplcatif impose de ne supprimer aucune séquence du génome viral essentielle à sa réplcation, et à la production de particules virales infectieuses chez l'hôte (cycle viral productif). On ne connaît à l'heure actuelle, chez les adénovirus, qu'un petit nombre de sites d'insertion de séquences hétérologues permettant de satisfaire à ces exigences.

Des vecteurs réplcatifs ont été obtenus par insertion de gènes hétérologues dans des régions non-essentiellles comme la région E3 et la partie droite du génome entre l'ITR droite et les séquences de régulation transcriptionnelle du promoteur E4. Des vecteurs réplcatifs ont également été obtenus par insertion d'un gène hétérologue dans la partie gauche du génome entre l'ITR gauche et la région E1, sous réserve de conserver des gènes E1 fonctionnels. De façon plus précise, l'insertion d'une séquence hétérologue entre les positions 455 et 917 de l'adénovirus humain (Ad5) qui inactive le gène E1A par délétion du promoteur et d'une partie de la région codante de E1A, est compensée par l'insertion d'une copie de ce gène en position ectopique dans le vecteur (ELOIT et al., J. Gen. Virol., 76, 1583-1589, 1995).

Des vecteurs réplcatifs ont été construits de la sorte à partir d'adénovirus humains (ELOIT et al., précité ; LAMBRIGHT et al., Gene Therapy, 8, 946-953, 2001), bovins (MITTAL et al., J. Gen. Virol., 76, 93-102, 1995), ovins (XU et al., Virology, 230, 62-71, 1997), aviaires (MICHOU et al., J. Virol., 73, 1399-1410, 1999 ; SHEPPARD et al., Arch. Virol., 143, 915-930, 1998, canins (Cav2 ; Demande Internationale WO 98/00166 et Brevet US 6090393, au nom de RHONE MERIEUX ; Demande Internationale WO 91/11525 et Brevet US 5616326, au nom de l'UNIVERSITE de GLASGOW, et Cav1 MORRISON et al., Virology, 293, 26-30, 2002) et porcins (REDDY et al., J. Gen. Virol., 80, 563-570, 1999 ; TUBOLY et al., J. Gen. Virol., 82, 183-190, 2001).

Ces vecteurs adénoviraux réplcatifs ont été développés essentiellement pour des applications vaccinales. Ils ont de manière générale, démontré une grande efficacité

lors de l'induction de réponses immunes, aussi bien pour ce qui concerne la réponse en anticorps que la réponse en CTL (pour une revue voir ELOIT, *Virologie*, 2, 109-120, 1998 et KLONJKOWSKI et al., In « *Adenoviruses : basic biology to gene therapy* », pp. 163-173, P. Seth, Ed., 1999, R. G. Landes Company, Austin Texas, USA).

Ces vecteurs réplicatifs présentent cependant quelques inconvénients :

- ils posent des problèmes de biosécurité liés au risque de diffusion de tels virus réplicatifs,

- la quantité importante de particules virales produite par les cellules infectées entraîne l'induction d'une réponse immune élevée contre le vecteur et limite l'efficacité des injections de rappel,

- la neutralisation par les anticorps maternels de l'antigène vaccinal relargué à partir de cellules détruites par l'infection, diminue l'efficacité de ces vecteurs réplicatifs chez le jeune.

Il apparaît qu'on ne dispose à l'heure actuelle d'aucun adénovirus recombinant permettant de transduire efficacement des cellules, en particulier les cellules en division comme les cellules tumorales sans présenter de risques de dissémination dans l'environnement.

En choisissant comme modèle expérimental l'adénovirus canin de type 2 (Cav2), les Inventeurs ont recherché s'il était possible d'identifier de nouveaux sites d'insertion permettant d'obtenir des adénovirus recombinants réplicatifs.

Ils ont ainsi constaté que la délétion d'une petite portion du début de la région située entre la fin de l'ITR gauche et le début de la séquence codant E1A n'affectaient pas la capacité des adénovirus à répliquer leur génome et à se multiplier chez un hôte permissif ; l'emplacement de cette délétion peut donc constituer un nouveau site d'insertion de gènes hétérologues.

En outre, les Inventeurs ont constaté que, de manière surprenante, d'autres délétions dans la même région permettaient d'obtenir des adénovirus capables de répliquer

leur génome chez un hôte permissif, mais incapables de se multiplier. Ces adénovirus seront dénommés ci-après « adénovirus pseudo-réplicatifs ».

5 Dans ce qui suit, les positions des différentes régions du génome adénoviral sont définies par référence aux positions des régions correspondantes, (c'est à dire contenant des éléments de fonction similaire) du génome de l'adénovirus canin de type 2 dans la séquence GenBank J04368.

10 Ainsi, la région située, chez un adénovirus quelconque, entre la fin de l'ITR gauche et le début de la séquence codant E1A, est définie ici comme correspondant à celle située entre la position 311 et la position 499 dans la séquence GenBank J04368 de l'adénovirus canin de type 2:

15 La présente invention a pour objet un adénovirus recombinant susceptible d'être obtenu à partir d'un adénovirus réplcatif par délétion de tout ou partie de la région du génome dudit adénovirus réplcatif correspondant à celle située, dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368), entre les positions 311 et 499, ladite

20 délétion comprenant tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

25 Selon un premier mode de réalisation d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, la portion délétée est constituée par tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion permet
30 d'obtenir un adénovirus recombinant réplcatif capable de se multiplier chez un hôte permissif à l'infection par l'adénovirus sauvage d'origine (cycle viral productif).

35 Selon un second mode de réalisation d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, la portion délétée comprend tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus réplcatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 318 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion permet

avantageusement d'obtenir des adénovirus pseudo-réplicatifs, c'est à dire capables de se répliquer mais incapables de produire des particules virales infectieuses et donc incapables de se multiplier (cycle abortif) chez un hôte permissif à l'infection par l'adénovirus sauvage d'origine.

L'obtention des adénovirus pseudo-réplicatifs conformes à l'invention implique notamment la suppression d'au moins un des signaux d'encapsidation putatifs du type 5'-TTTA/G-3' A_X , A_{XI} , et A_{XII} (situés respectivement en positions 341-344, 377-380, et 388-391, dans la séquence de Cav2 GenBank J04368).

La portion déléetée dans ces adénovirus pseudo-réplicatifs peut comprendre en outre :

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 400 et 439 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion supprime notamment la boîte TATA du promoteur d'E1A (située en position 409 dans la séquence de Cav2 GenBank J04368) ;

et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 438 et 499 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; cette délétion supprime notamment le site d'initiation de la transcription d'E1A (situé en position 439 dans la séquence de Cav2 GenBank J04368).

Dans tous les cas, les adénovirus recombinants (réplicatifs ou pseudo-réplicatifs) conformes à l'invention conservent les séquences de l'ITR gauche indispensables à la répliation, à l'activation de la transcription (4 motifs GGTCA répétés situés entre les positions 62 et 99 dans le génome de Cav2) ainsi que les signaux d'encapsidation A_I de type 5'-TTGN₈CG-3', et A_{II} à A_{IX} de type 5'-TTTA/G-3' (situés

respectivement aux positions 197-200, 206-209, 213-216, 226-232, 239-242, 250-253, 258-261, 272-275 et 306-309 dans le génome de Cav2). Ils conservent également la totalité de la séquence codante d'E1A ainsi que des régions du gène E1
5 situées en aval de celle-ci (signal de polyadénylation d'E1A et région E1B).

Selon un mode de réalisation préféré d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, il comprend en outre au moins une séquence hétérologue d'intérêt insérée
10 dans son génome.

Pour la construction d'un adénovirus recombinant conforme à ce mode de réalisation, ladite séquence hétérologue sera, dans le cas d'un adénovirus répliquatif, insérée dans la région du génome correspondant à celle située
15 entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

Dans le cas d'un adénovirus pseudo-répliquatif, ladite séquence hétérologue peut également être insérée dans cette région, ou à tout autre endroit de la région du génome
20 correspondant à celle située entre les positions 311 et 499 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2. L'insertion dans cette région peut s'effectuer en lieu et place de la portion déléetée ou à proximité de celle-ci.

On peut également insérer une séquence
25 hétérologue dans un quelconque des sites qui sont habituellement utilisés à cet effet pour la construction d'adénovirus répliquatifs. L'insertion peut par exemple être effectuée dans la région E3, ou dans la région située entre la région E4 et l'ITR droite, comme décrit dans le Brevet US
30 6090393, ou dans la portion 3' de l'ITR droite, comme décrit dans le Brevet US 5616326.

On entend par « séquence hétérologue », toute séquence autre que celle comprise entre les positions 311 et 499 du génome dudit adénovirus sauvage.

35 A titre d'exemples non-limitatifs, on peut citer :

- des gènes codant pour un antigène vaccinal, par exemple les gènes gag ou env du virus de l'immunodéficience

féline (FIV), la protéine S, M ou N du coronavirus félin, une protéine de capsid de parvovirus canin ou félin, la glycoprotéine G du virus de la rage ou la protéine Hap-1 de *Leptospira* sp., etc.

- 5 - des gènes correcteurs utilisables en thérapie génique, par exemple celui de l'érythropoïétine (Epo), du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), de la neurotrophine 3 (NT-3) ou du facteur atrial natriurétique (ANF), etc. ;

- 10 - des gènes utilisables pour le traitement du cancer, par exemple celui de l'IL-2, de l'IFN γ , etc.

Des adénovirus recombinants conformes à l'invention peuvent en particulier être issus d'adénovirus de mammifères, et notamment d'adénovirus canins, en particulier
15 d'adénovirus canins de type 2.

Les adénovirus recombinants conformes à la présente invention peuvent être préparés par des techniques usuelles, bien connues en elles-mêmes de l'homme de l'art (cf. par exemple GRAHAM et PREVEC (Manipulation of Adenovirus
20 Vectors, Methods Mol. Biol., 7, 109-128, 1991), notamment par des techniques comprenant : (i) la génération de génomes recombinants chez *E.coli* par des techniques classiques de double recombinaison homologue et (ii) la transfection des
25 génomes recombinants ainsi obtenus dans des lignées cellulaires appropriées permettant l'amplification desdits génomes et leur encapsidation dans des particules virales infectieuses.

On pourra par exemple utiliser des techniques de recombinaison homologue chez *E.coli*, telles que celles
30 décrites par CHARTIER et al., (J. Virol., 70, 7, 4805-4840, 1996) et dans le Brevet US 6110735 au nom de TRANSGENE ou bien celles décrites par CROUZET et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 94, 1414-1419, 1997). Ces procédés sont basés sur une recombinaison homologue intermoléculaire entre une molécule
35 d'ADN « receveuse » contenant le génome complet d'un adénovirus, et une molécule d'ADN « donneuse » comprenant une séquence hétérologue à insérer dans ledit génome, flanquée de séquences homologues à celles de la région du génome

adénoviral où l'on souhaite effectuer l'insertion. La molécule receveuse est linéarisée par clivage à un site de restriction unique dans le génome de l'adénovirus, situé au niveau du site d'insertion. La sélection des génomes
5 recombinaux repose ensuite sur la circularisation de la molécule receveuse.

Ces procédés présentent donc l'inconvénient de ne pouvoir insérer ladite séquence hétérologue que dans une région comprenant un site de restriction unique dans le
10 génome de l'adénovirus.

Les Inventeurs ont maintenant mis au point un procédé d'insertion d'une séquence hétérologue dans un adénovirus, qui ne nécessite pas la linéarisation du génome de l'adénovirus par clivage au niveau du site d'insertion

15 Ce procédé diffère de celui décrit par CHARTIER et al. en ce que :

1) le fragment d'ADN hétérologue (molécule donneuse) à insérer dans le génome de l'adénovirus (molécule receveuse), comprend un marqueur de sélection permettant
20 d'isoler les plasmides recombinants sur leur double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, et

2) ledit fragment est co-transformé avec une molécule receveuse, soit sous forme circulaire, soit sous forme linéarisée par clivage au niveau d'un site de
25 restriction situé en dehors du site d'insertion.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un adénovirus recombinant par recombinaison intermoléculaire homologue dans une cellule procaryote caractérisé en ce qu'il comprend les
30 étapes suivantes :

α) introduction dans ladite cellule procaryote:
(i) d'un plasmide comprenant le génome d'un adénovirus et un premier gène de sélection ; et (ii) d'un fragment d'ADN préalablement linéarisé comprenant une séquence hétérologue à
35 insérer dans ledit génome flanquée de séquences homologues à celles flanquant le site dudit plasmide où doit s'effectuer l'insertion, et incluant un second gène de sélection, différent du premier ; et

β) culture de ladite cellule procaryote dans des conditions sélectives, afin de permettre la génération et la sélection de cellules contenant des plasmides recombinants exprimant le premier et le second gène de sélection, et

5 γ) isolement du génome dudit adénovirus recombinant à partir des cellules sélectionnées.

On entend par : « conditions sélectives », des conditions de culture dans lesquelles le premier et le second agent de sélection (par exemple antibiotique) sont présents à
10 des concentrations ne permettant pas la multiplication des cellules non-transformées mais permettant la multiplication des cellules co-transformées.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le plasmide utilisé en α) est sous forme
15 circulaire.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, le plasmide utilisé à l'étape α) est préalablement linéarisé par clivage au niveau d'un site de restriction situé à l'extérieur du site d'insertion.

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le premier et/ou le second gène de sélection est un gène de résistance à un antibiotique, par exemple un gène de résistance à l'ampicilline ou à la kanamycine.

Selon encore un autre mode de réalisation de
25 l'invention, le second gène de sélection est entouré de 2 sites de restriction, identiques ou différents, absents dans le génome de l'adénovirus utilisé à l'étape α) ; un tel gène de sélection peut ainsi être excisé de la séquence du génome de l'adénovirus recombinant par digestion au niveau de
30 ces sites.

Avantageusement, le procédé conforme à l'invention comprend, après la préparation du génome recombinant selon les étapes α) à γ) ci-dessus, une étape additionnelle de transfection du génome recombinant dans une
35 lignée cellulaire appropriée permettant l'amplification dudit génome et son encapsidation dans des particules virales infectieuses.

Pour préparer des adénovirus recombinants conformes à l'invention, on peut utiliser des lignées cellulaires connues en elles-mêmes de l'homme de l'art (cf. par exemple GRAHAM et PREVEC, précité), exprimant la région E1 de l'adénovirus, et éventuellement toute autre région de l'adénovirus (par exemple la région E4) lorsque cette dernière a été altérée par l'insertion d'une séquence hétérologue d'intérêt. Parmi les lignées utilisables, on peut citer notamment des lignées humaines telles que la lignée 293 (GRAHAM et al., J. Gen. Virol., 36, 59-74, 1977) et des lignées canines telle que la lignée DK/E1-28 (KLONJKOWSKI et al., Human Gene Therapy, précité). Avantageusement, on pourra utiliser une nouvelle lignée construite par les Inventeurs, qui est modifiée par l'insertion d'un fragment constitué par la séquence correspondant à celle qui s'étend des positions 439 à 3595 du génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368) ; une telle lignée ne comprend pas les séquences situées en amont de la position 439, qui sont présentes dans les lignées de l'art antérieur mentionnées ci-dessus.

De manière préférée, ladite lignée cellulaire est d'origine canine.

L'invention a en outre pour objet des plasmides et des molécules d'acide nucléiques utilisables pour la préparation du génome d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, notamment un adénovirus canin, ainsi que lesdits génomes recombinants, susceptibles d'être obtenus par les procédés tels que définis ci-dessus.

L'invention a en particulier pour objet les molécules d'acide nucléique et les plasmides suivants :

- toute molécule d'acide nucléique sélectionnée dans le groupe constitué par :

a) une molécule d'acide nucléique représentant le génome d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention tel que défini ci-dessus ;

b) une molécule d'acide nucléique constituée par un fragment de la molécule a) ci-dessus, comprenant entre 10 et 1000 pb, de préférence au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus répliquatif d'origine située en amont de la

portion délétée et entre 10 et 5000 pb, de préférence entre 10 et 1000 pb, de manière préférée au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus répliquatif d'origine située en aval de la portion délétée ; une telle molécule peut comprendre en
5 outre tout ou partie d'une séquence hétérologue insérée en lieu et place de la portion délétée ou à proximité de celle-ci.

- tout vecteur d'acide nucléique, notamment tout plasmide, contenant une molécule d'acide nucléique a) ou b)
10 telle que définie ci-dessus.

L'invention a en outre pour objet les adénovirus recombinants conformes à l'invention pour une utilisation comme médicament.

L'invention a notamment pour objet l'utilisation
15 des adénovirus conformes à l'invention, pour la préparation de compositions immunogènes ou vaccinales, ou de médicaments destinés à la thérapie génique ou au traitement du cancer, ainsi que pour la production de protéines recombinantes.

Ledit médicament ou ladite composition peuvent
20 être administrés chez des animaux, notamment des mammifères, en particulier des carnivores domestiques ou sauvages, tels que le chat, le chien ou le renard, ou bien chez l'Homme.

Les adénovirus recombinants conformes à l'invention sont particulièrement bien adaptés aux
25 utilisations thérapeutiques, par exemple vaccinales, chez l'homme et l'animal. En effet, contrairement aux adénovirus recombinants non-répliquatifs dont le génome est présent en faible nombre de copies par cellule et rapidement éliminé dans les cellules en division active, les adénovirus
30 recombinants conformes à l'invention, répliquatifs ou pseudorépliquatifs, se multiplient de façon importante dans le noyau des cellules transduites permettant de transduire efficacement aussi bien des cellules quiescentes que des cellules en division active comme les cellules tumorales. En
35 outre, les adénovirus pseudo-répliquatifs conformes à l'invention qui ne produisent aucune particule infectieuse présentent une grande biosécurité et permettent en outre

d'induire une forte réponse immune lors d'injections de rappel.

Des adénovirus recombinants conformes à l'invention, par exemple ceux dérivés de l'adénovirus canin, ont des applications pour la vaccination et le traitement du cancer chez les carnivores domestiques ou sauvages, notamment le chat, le chien ou le renard. En outre, du fait d'un tropisme d'hôte propre, ces adénovirus canins peuvent être utilisés en thérapie génique humaine, en particulier pour cibler des tissus différents de ceux qui peuvent être transduits par les vecteurs humains, par exemple des cellules du système nerveux central.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de Description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant la construction et la préparation d'un adénovirus recombinant conforme à l'invention, et son utilisation pour l'expression de gènes d'intérêt, notamment pour la vaccination.

EXEMPLE 1: CONSTRUCTION DES ADENOVIRUS CAV 311-319, CAV 311-439 ET CAV 311-401

1) Construction des plasmides recombinants

Les plasmides suivants ont été construits en utilisant les protocoles classiques de préparation, de clonage et d'analyse de l'ADN tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)

a) Plasmide pCav2 contenant la séquence complète du génome de l'adénovirus canin de type 2 (Cav2)

Ce plasmide est construit par recombinaison homologue dans *E. coli*, de manière analogue au procédé de préparation d'adénovirus humains, décrit dans CHARTIER et al., précité.

Les principales étapes de construction de ce plasmide sont présentées à la Figure 1.

De manière plus précise, les extrémités gauche et droite du génome de la souche Manhattan de Cav2 correspondant aux séquences des positions 1 à 1060 (fragment A) et 29323-

31323 (fragment B) sont amplifiées séparément par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche Manhattan de Cav2 (APPEL et al., Am. J. Vet. Res., 34, 543-550, 1973), à l'aide des amorces suivantes :

5 Fragment A

5'-TTGGCGCGCCCATCATCAATAATATACAGGAC-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2)

Fragment B

5'-TTGGCGCGCCCATCATCAATAATATACAGGAC-3' (SEQ ID NO: 1)

10 5'-GCTCTAGAGGGTGATTATTAACAACGTC-3' (SEQ ID NO: 3)

Les fragments A et B obtenus sont clonés séparément dans le plasmide pCR2.1 (TA Cloning System, INVITROGEN) pour donner respectivement les plasmides pCR2.1/ITR gauche et pCR2.1/ITR droit. Le plasmide pCR2.1/ITR gauche est digéré par BamHI et XbaI et le fragment de 1111 pb ainsi généré est cloné entre les sites BamHI et XbaI du plasmide pPolyII Amp^R (GenBank M18128, LATHE et al., Gene, 57, 193-201, 1987) pour donner le plasmide dénommé pPolyII/ITR gauche. Le plasmide pCR2.1/ITR droit est clivé par BamHI, traité par la polymérase de Klenow, puis clivé par XbaI ; le fragment de 2052 pb ainsi généré est cloné entre les sites XbaI et PvuII du plasmide pPolyII/ITR gauche pour donner le plasmide pPolyII.ITRs.Cav2. Ce plasmide contient les extrémités gauche et droite du génome de la souche Manhattan de Cav2 clonées sous forme d'un fragment AscI-AscI de 3073 pb comprenant un site XbaI en position 1066 dudit fragment, permettant de linéariser le plasmide au niveau du site d'insertion de l'ADN.

L'ADN génomique de la souche Manhattan de Cav2 et l'ADN de pPolyII.ITRs.Cav2 linéarisé au site XbaI sont co-transformés dans la souche d'E. coli BJ5183 recBC sbcBC (HANAHAN et al., J. Mol. Biol., 166, 557-580, 1983). Un plasmide recombinant de 33425 pb, dénommé pCav2, est isolé à partir des colonies résistantes à l'ampicilline.

35 Le plasmide pCav2 contient le génome complet de Cav2 (souche Manhattan) cloné sous forme d'un fragment de 31331 pb flanqué de deux sites AscI qui sont uniques dans ce plasmide, ces sites étant absents dans le génome de Cav2

(souches Manhattan et Toronto) ainsi que dans celui de la souche d'adénovirus ovin OAV.

b) Plasmides navettes

b.) pNavette/311-439/CMV_eGFP

5 Ce plasmide de 6111 pb dérive du plasmide pBluescript KS (STRATAGENE) par insertion des séquences de Cav2 en amont et en aval de la délétion 312-438 (UpRecSeq 1-311 et DownRecSeq 439-1060), de part et d'autre d'une cassette d'expression du gène rapporteur GFP.

10 Ce plasmide est construit selon les étapes suivantes :

1°) un fragment C correspondant à la séquence des positions 1 à 311 (UpRecSeq) de Cav2, est amplifié par PCR à l'aide des amorces :

15 5'-TTGGCGCCCATCATCAATAATATACAGGAC-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-CCGACGTCGACCATAAACTTTGACATTAGCCG-3 (SEQ ID NO: 4).

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/UpRecSeq (1-311).

20 2°) un fragment D correspondant à la séquence des positions 439 à 1060 (DownRecSeq) de Cav2, est amplifié par PCR à l'aide des amorces :

5'-GCTCTAGAGCGAAGATCTCCAACAGCAATACACTCTTG-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2).

25 Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/DownRecSeq (439-1060).

30 3°) un fragment E d'environ 2050 pb contenant le promoteur précoce du cytomégalovirus, un intron, la séquence codante de l'eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) et un signal de polyadénylation, est obtenu selon les étapes suivantes :

Le plasmide pEGFP-1 (CLONTECH) est clivé par BamHI, traité avec la polymérase de Klenow puis digéré par NotI ; le fragment de 741 pb ainsi obtenu est cloné entre les sites XhoI (préalablement réparé par traitement avec la

polymérase de Klenow) et NotI du plasmide pCI (PROMEGA), pour donner le plasmide pCMVeGFP.

Le plasmide pCMVeGFP est ensuite clivé par BglII, traité avec la polymérase de Klenow puis digéré par BamHI
5 pour générer un fragment de 2050 pb (fragment E).

4°) Le fragment E est inséré entre les sites SmaI et BamHI du plasmide pBLUESCRIPT KS pour donner le plasmide pKS/CMVeGFP. Le plasmide pCR2.1/UpRecSeq(1-311) est clivé par KpnI et SalI et le fragment de 371 pb ainsi obtenu (fragment
10 C) est cloné entre les sites KpnI et SalI du plasmide pKS/CMVeGFP, pour donner le plasmide pKS/CMVeGFP-C. Le plasmide pCR2.1/DownRecSeq(439-1060) est clivé par XbaI et le fragment de 650 pb ainsi obtenu (fragment D) est inséré au site XbaI du plasmide pKS/CMVeGFP-C, pour donner le plasmide
15 dénommé pNavette 311-439/CMVeGFP.

b.) pNavette 311-401/CMVeGFP

Le plasmide navette pNavette 311-401/CMVeGFP est construit à partir du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP, selon les étapes suivantes :

20 La séquence 401-1060(DownRecSeq) est amplifiée, par PCR à l'aide des amorces :

5'-GATAAGGATCACGCGGCCTTAAATTCTCAG-3' (SEQ ID NO: 6)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2).

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le
25 plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/DownRecSeq(401-1060).

Ce plasmide pCR2.1/DownRecSeq(401-1060) est digéré par EcoRI puis traité par la polymérase de Klenow et le fragment 401-1060 ainsi obtenu est substitué au fragment
30 439-1060 du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP préalablement digéré par XbaI puis traité par la polymérase de Klenow, pour donner le plasmide pNavette 311-401/CMVeGFP.

b.) pNavette 311-319/CMVeGFP

Le plasmide navette pNavette 311-319/CMVeGFP est
35 construit à partir du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP, selon les étapes suivantes :

La séquence 319-1060 (DownRecSeq) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces :

5'-GATAAGGATCAACAGAAACACTCTGTTCTCTG-3' (SEQ ID NO: 7)

5'-GCTCTAGACCTGCCCAAACATTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2).

5 Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/DownRecSeq(319-1060).

10 Ce plasmide pCR2.1/DownRecSeq(319-1060) est digéré par EcoRI puis traité par la polymérase de Klenow et le fragment 319-1060 ainsi obtenu est substitué au fragment 439-1060 du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP préalablement digéré par XbaI puis traité par la polymérase de Klenow, pour donner le plasmide pNavette 311-319/CMVeGFP.

h.) Plasmide navette pNavette 311-439/CMVeGFP/Kana

15 Ce plasmide de 7027 pb dérivé du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP par clonage au site *PmeI* d'une cassette d'expression d'un gène de résistance à la kanamycine en orientation opposée à celle de la cassette de la GFP, est obtenu selon les étapes suivantes :

20 La phase codante du gène Kana est amplifiée par PCR à partir du plasmide pET-29a(+) (NOVAGEN) à l'aide des amorces :

5'-AGCTTTGTTTAAACGGCGCGCCGGGATTTTGGTCATGAAC-3' (SEQ ID NO: 8)

5'-CCGGCGCGCCGTTTAAACAAAGCTATCCGCTCATGAA-3' (SEQ ID NO: 9).

25 Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1-Kana/*PmeI*. Le plasmide pCR2.1-Kana/*PmeI* est clivé par EcoRI, traité par la polymérase de Klenow et le fragment d'environ 959 pb contenant la phase codante du gène Kana est inséré au site
30 EcoRV du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP pour donner le plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP/Kana.

35 Ce plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP/Kana représenté à la Figure 2, qui contient un gène de résistance à un antibiotique, cloné entre les séquences adénovirales cibles de la recombinaison, en amont de la séquence hétérologue à insérer, permet avantageusement de sélectionner les recombinants qui sont résistants à la fois à

l'ampicilline et à la kanamycine. En outre, le gène Kana qui est ensuite excisé du plasmide recombinant par digestion au niveau des 2 sites *PmeI*, est absent de la séquence de l'adénovirus recombinant généré à partir de ce plasmide.

5 *b.) Plasmide navette pPoly II 311-439/CMVeGFP/Kana (Figure 2)*

Ce plasmide de 6332 pb est obtenu par clonage entre les sites *KpnI* (position 42) et *PvuII* (position 63) du plasmide pPoly II, du fragment *KpnI*-*PvuII* de 4292 pb du pNavette 311-439/CMVeGFP, comme illustré à la Figure 2.

10 c) Plasmide pCav 311-439/CMVeGFP

Ce plasmide est obtenu par recombinaison homologue dans la souche d'*E. coli* BJ5183 selon les 2 alternatives c1 et c2 suivantes, illustrées respectivement par les Figures 3 et 4 :

15 *c1) recombinaison de pNavette 311-439/CMVeGFP.Kana avec le plasmide pCav2 sous forme circulaire (Figure 3)*

1) la molécule donneuse contenant les séquences de recombinaison amont (UpRecSeq 1-311) et aval (DownRecSeq 439-1060) et les cassettes CMVeGFP et Kana est préparée à partir du plasmide pNavette 311-439/CMVeGFP.Kana par digestion avec les enzymes de restriction *KpnI* et *EcoRV*,

2) le fragment obtenu en 1) et le plasmide pCav2 (*Amp^R*) sous forme circulaire sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5183, et

25 3) les plasmides recombinants sont isolés sur le critère de la double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. La séquence de l'un d'entre eux, pCav 311-439/CMVeGFP.Kana est confirmée par restriction enzymatique et par séquençage.

30 4) la cassette Kana est ensuite excisée par digestion avec l'enzyme de restriction *PmeI*, de façon à obtenir le plasmide pCav 311-439/CMVeGFP contenant le génome de Cav2 délété de la séquence 312-438 qui est substituée par une cassette d'expression de la GFP.

c.) recombinaison de pPolyII 311-439/CMVeGFP.Kana avec le plasmide pCav2 préalablement linéarisé en dehors du site d'insertion (Figure 4).

1) la molécule donneuse est préparée à partir du
5 plasmide pPolyII 311-439/CMVeGFP.Kana par digestion avec l'enzyme de restriction Swa I,

2) le plasmide pCav2 est linéarisé par clivage au site PvuI,

3) le fragment obtenu en 1) et le plasmide pCav2
10 linéarisé obtenu en 2') sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5183, et

4) les plasmides recombinants sont isolés sur le critère de la double résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. La séquence de l'un d'entre eux, pCav 311-
15 439/CMVeGFP.Kana est confirmée par restriction enzymatique et par séquençage.

5) la cassette Kana est ensuite excisée par digestion avec l'enzyme de restriction *PmeI*, de façon à obtenir le plasmide pCav 311-439/CMVeGFP, contenant le génome
20 de Cav2 délété de la séquence 312-438 qui est substituée par une cassette d'expression de la GFP.

d) Plasmide pCav 311-401/CMVeGFP

Le plasmide pNavette 311-401/CMVeGFP est digéré par *KpnI* et *SwaI* et le fragment de 3167 pb ainsi obtenu et le
25 plasmide pCav 311-439/CMVeGFP linéarisé au site *PmeI* sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5185. Le plasmide recombinant pCav 311-401/CMVeGFP généré par recombinaison homologue, est sélectionné sur le critère de la résistance à l'ampicilline.

30 e) Plasmide pCav 311-319/CMVeGFP

Le plasmide pNavette 311-319/CMVeGFP est digéré par *KpnI* et *SwaI* et le fragment de 3249 pb ainsi obtenu et le
35 plasmide pCav 311-439/CMVeGFP linéarisé au site *PmeI* sont co-transformés dans la souche d'*E. coli* BJ5185. Le plasmide recombinant pCav 311-319/CMVeGFP généré par recombinaison homologue, est sélectionné sur le critère de la résistance à l'ampicilline.

2) Production des virus recombinants

Les plasmides pCav 311-439/CMVeGFP, pCav 311-401/CMVeGFP ou pCav 311-319/CMVeGFP sont digérés par l'enzyme de restriction AscI afin d'exciser les séquences du génome de l'adénovirus recombinant. Le génome adénoviral excisé est ensuite transfecté dans la lignée cellulaire canine DK/E1-28 qui exprime constitutivement la région E1 de Cav2 (KLONJKOWSKI et al., Human Gene Therapy, précité), en présence de Lipofectamine (GIBCO), selon les techniques usuelles, bien connues en elles mêmes de l'homme de l'art (cf. par exemple GRAHAM et PREVEC, précité). Lorsqu'un effet cytopathique est observé, le virus est récolté à partir des cellules transfectées, puis amplifié dans la même lignée cellulaire DK/E1-28 et purifié par centrifugation sur un gradient de chlorure de césium, selon un protocole classique, tel que décrit par exemple dans GRAHAM et PREVEC, précité.

La séquence génomique des virus Cav 311-439/CMVeGFP, Cav 311-401/CMVeGFP et Cav 311-319/CMVeGFP est confirmée par restriction enzymatique et par séquençage partiel de l'ADN viral extrait des cellules DK/E1-28 infectées, préparé selon la technique de HIRT (J. Mol. Biol., 26, 365-369, 1967). Les préparations de virus Cav recombinants sont titrées par dilution limite en plaque à 96 puits, selon la méthode de SPEARMAN et KÄRBER (Virology Methods Manual, Brian W J Mahy and Hillar O Kangro, 1996, Academic Press, Harcourt Brace & Company). Le titre en TCID₅₀/ml obtenu par cette méthode est équivalent au titre en ufp/ml obtenu par la méthode des plages sur cellules DK, selon le protocole décrit dans KLONJKOWSKI et al., précité.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- les virus Cav 311-439/CMVeGFP, Cav 311-401/CMVeGFP, Cav 311-319/CMVeGFP isolés présentent un profil de restriction et une séquence conformes à ceux attendus ;
- les virus Cav 311-439/CMVeGFP, Cav 311-401/CMVeGFP et Cav 311-319/CMVeGFP purifiés présentent un titre d'environ $10^{9,2}$ ufp/ml.

EXEMPLE 2 : CARACTERISATION DU VIRUS RECOMBINANT CAV 311-439

1) Analyse de l'efficacité de transduction et de l'effet cytopathique de Cav 311-439 CMVeGFP dans les cellules félines et canines

5 Des lignées de cellules canines (DK/E1-28 et DK) ou félines (CRFK) sont infectées par le virus Cav 311-439/CMVeGFP, à une multiplicité d'infection de 10 ufp/cellule. Des cellules non-infectées et des cellules infectées par le virus Cav2 de type sauvage (Cav2) sont
10 utilisées comme témoin.

3 et 5 jours après l'infection, la présence d'un effet cytopathique (ECP) est analysée par observation des cellules infectées au microscope optique. En outre, l'expression du transgène dans les cellules infectées par le
15 virus Cav 311-439/CMVeGFP est confirmée par détection de la GFP en microscopie de fluorescence.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans les Tableaux I et II ci-dessous :

TABLEAU I

Virus	DK	DK/E1-28	CRFK
Cav 311-439/CMVeGFP	-	++	-
Cav2	+	++	-
Témoin	-	-	-

TABLEAU II

Cellules infectées par Cav 311-439/CMVeGFP	ECP	GFP
DK	-	+
DK/E1-28	++	+++

Ces résultats montrent que :

- un niveau d'expression élevé du transgène est observé dans les cellules infectées par le virus Cav 311-439/CMVeGFP, et
- 25 - aucun effet cytopathique n'est observé dans les cellules canines non modifiées (cellules DK) ou félines infectées par ce virus Cav 311-439/CMVeGFP ; un effet cytopathique important est observé uniquement dans les cellules canines exprimant la région E1 infectées par ce
30 virus Cav311-439/CMVeGFP,
- dans les contrôles, un effet cytopathique important est observé dans les cellules canines (DK et DK/E1-

28) infectées par le Cav de type sauvage (Cav2), et aucun effet cytopathique n'est observé dans les cellules félines infectées par le Cav2.

Les résultats de ces expériences montrent que les virus Cav 311-439 sont capables de transduire très efficacement les cellules sans induire d'effet cytopathique dans les cellules canines conventionnelles qui sont permissives à la réplication des adénovirus canins de type sauvage, ainsi que dans les cellules félines.

10 2) Analyse de la réplication de Cav 311-439/CMVeGFP dans les cellules félines et canines

Des lignées de cellules canines (DK/E1-28 et DK) ou félines (CRFK) sont infectées par le virus Cav 311-439/CMVeGFP, à une multiplicité d'infection de 15 10 ufp/cellule. Des cellules non-infectées et des cellules infectées par le virus Cav2 de type sauvage sont utilisées comme témoins.

2, 24, 48 et 72 heures après l'infection, les cellules sont récoltées et centrifugées. L'ADN viral 20 intracellulaire est préparé selon la technique de HIRT (J. Mol. Biol., 26, 365-369, 1967), digéré par l'enzyme *EcoRI*, puis visualisé sur gel d'agarose après migration électrophorétique.

Les résultats sont présentés à la Figure 5 :

25 Légende de la Figure 5 : l'ADN viral extrait de cellules félines (CRFK) ou canines (DK, DK/E1-28) à différents temps après l'infection (2, 24, 48 et 72 heures) par l'adénovirus Cav 311-439/CMVeGFP est digéré par *EcoRI* et analysé en gel d'agarose. La lignée DK/E1-28 qui exprime la 30 région E1 de l'adénovirus est utilisée comme témoin positif de la réplication.

Ces résultats montrent que :

- le virus Cav 311-439/CMVeGFP réplique son génome dans les lignées canines et félines testées,
- 35 - le niveau de réplication est plus important dans les cellules canines que dans les cellules félines,

- le pic de réplication est atteint à 24 heures dans les cellules DK/E1-28 et à 48 heures dans les cellules DK, vraisemblablement en raison de l'expression cellulaire de la région E1 dans les cellules DK/E1-28.

5 Par comparaison, dans les cellules témoins infectées par le virus Cav2 de type sauvage, on observe une quantité similaire d'ADN génomique dans les 3 lignées cellulaires.

10 Les résultats de cette expérience démontrent que la délétion 311-439 n'affecte pas la réplication de l'adénovirus canin: les vecteurs portant cette délétion (Cav 311-439/CMVeGFP) se comportent comme les adénovirus sauvages en ce qui concerne la réplication de leur génome dans des cellules canines ou félines.

15 3) Analyse de la production de particules virales dans les cellules canines infectées par le virus Cav 311-439/CMVeGFP

Des lignées de cellules canines DK sont infectées par le vecteur Cav 311-439/CMVeGFP, à une multiplicité d'infection de respectivement 0,1, 1 et 10 ufp/cellule. Des
20 cellules non-infectées et des cellules infectées par le virus Cav2 de type sauvage sont utilisées comme témoin.

Les cellules infectées sont récoltées 2 heures et 6 jours après l'infection, lysées par plusieurs cycles de congélation et de décongélation. Le lysat cellulaire est
25 titré par la technique des dilutions limites précitée.

La quantité de virus présente dans les cellules, exprimée en ufp/ml, est présentée dans le Tableau III ci-dessous.

TABLEAU III

Virus	Temps	0,1 ufp/cellule	1 ufp/cellule	10 ufp/cellule
Cav 311-439/CMVeGFP	J0	< 10 1,8	10 2,4	10 3
	J6	< 10 1,8	10 3	10 2,8
Cav2	J0	10 2	10 3	10 4,4
	J6	10 7,6	10 6,8	10 6,8

30 Ces résultats montrent que le virus Cav 311-439/CMVeGFP ne produit pas de particules virales infectieuses dans les cellules canines n'exprimant pas la région E1 comme les cellules DK : le cycle viral de Cav 311-439/CMVeGFP est abortif dans les cellules canines.

4) Vaccination de chats conventionnels avec le virus Cav 311-439/CMVeGFP

Des groupes de chats sont inoculés par voie intramusculaire avec les doses suivantes de Cav 311-

5 439/CMVeGFP :

groupe 1 (n=2) : $9,6 \cdot 10^7$ pfu

groupe 2 (n=2) : $9,6 \cdot 10^6$ pfu

groupe 3 (n =2) : témoin.

10 A J14, J21 et J31, les anticorps sériques anti-eGFP sont titrés par ELISA.

Les résultats sont présentés à la Figure 6.

Légende de la Figure 6 : Titres en anticorps sériques anti-eGFP (Ac) chez le chat, aux jours J7, J14, J21 et J31 après l'inoculation de différentes doses du virus Cav 311-439/CMVeGFP: -■- $9,6 \cdot 10^7$ ufp/ml (ufp: unités formant
15 plaque), -▲- $9,6 \cdot 10^7$ ufp/ml, ...□... $9,6 \cdot 10^6$ ufp/ml, ...○... $9,6 \cdot 10^6$ ufp/ml.

20 Ces résultats montrent qu'une seule injection de Cav 311-439/CMVeGFP permet d'induire chez le chat une réponse immune (humorale) spécifique du gène hétérologue inséré dans cet adénovirus recombinant.

EXEMPLE 3: CONSTRUCTION D'UNE LIGNEE D'ORIGINE CANINE EXPRIMANT CONSTITUTIVEMENT LA REGION E1 DE CAV2.

25 Une nouvelle lignée exprimant la région E1 est construite à partir de la lignée DK (lignée immortalisée de cellules de rein de chien; ATCC CRL 6247) en suivant les étapes suivantes :

30 La séquence des positions 439 à 3595 de Cav2 (souche Manhattan) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces suivantes:

5'-CGGCCGACTCTTGAGTGCGCAGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 10)

5'-GGCGCGCCGAGAGACAACGCTGGACACGG-3' (SEQ ID NO: 11)

Le produit d'amplification PCR est cloné dans le plasmide pCR2.1 pour donner le plasmide pCR2.1/E1.

35 Le plasmide pTRE (CLONTECH) est digéré par BamHI, traité par la polymérase de Klenow et recircularisé pour donner le plasmide pTRE/dl BamHI.

Le plasmide pCR2.1/E1 est digéré par EcoRI, le fragment de 3187 pb ainsi obtenu est cloné au site EcoRI du plasmide pTRE/dl BamHI pour donner le plasmide pTRE E1 Cav2.

Ce plasmide pTRE E1 Cav2 contient la séquence
5 codante de la protéine E1A sous le contrôle d'un promoteur CMV minimum et d'éléments de réponse de l'opéron Tet (Tet-Responsive Element ou TRE), les séquences codantes des protéines E1B (133R et 438R ; SHIBATA et al., Virology, 172, 460-467, 1989) sous le contrôle de leur propre promoteur et
10 les propre signaux de polyadénylation de ces séquences.

A partir du pTRE E1 Cav2, une lignée exprimant la région E1 est obtenue de manière analogue à la lignée DK/E1-28 (KLONJKOWSKI et al., précité).

De manière plus précise, les cellules DK sont co-
15 transfectées à l'aide du plasmide pTRE E1 Cav2 linéarisé au site AatII et du plasmide pTK-Hyg (CLONTECH) linéarisé au site AseI. Des clones sont sélectionnés en présence d'hygromycine (150 µg/ml) puis analysés par Southern blot, Northern blot, RT-PCR et Western blot. 4 clones exprimant la
20 région E1 (E1A et E1B), capables de produire efficacement les vecteurs délétés selon l'invention ont été isolés.

REVENDICATIONS

1) Adénovirus recombinant susceptible d'être obtenu à partir d'un adénovirus répliatif par délétion de tout ou partie de la région du génome dudit adénovirus répliatif correspondant à celle située, dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368), entre les positions 311 et 499, ladite délétion comprenant tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

2) Adénovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la portion délétée est constituée par tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

3) Adénovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la portion délétée comprend tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 318 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

4) Adénovirus recombinant, selon la revendication 3, caractérisé en ce que la portion délétée comprend en outre :

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 400 et 439 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 438 et 499 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

REVENDICATIONS

1) Adénovirus recombinant susceptible d'être obtenu à partir d'un adénovirus répliatif par délétion de tout ou partie de la région du génome dudit adénovirus répliatif correspondant à celle située, dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 (GenBank J04368), entre les positions 311 et 499, ladite délétion comprenant au moins une partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

2) Adénovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la portion délétée est constituée par tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

3) Adénovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la portion délétée comprend tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 318 et 401 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

4) Adénovirus recombinant, selon la revendication 3, caractérisé en ce que la portion délétée comprend en outre :

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 400 et 439 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2 ; et/ou

- tout ou partie de la région du génome de l'adénovirus répliatif d'origine correspondant à celle située entre les positions 438 et 499 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

5) Adénovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence hétérologue d'intérêt insérée dans son génome.

5 6) Adénovirus recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite séquence hétérologue est insérée dans la région du génome correspondant à celle située entre les positions 311 et 319 dans le génome de l'adénovirus canin de type 2.

10 7) Adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est issu d'un adénovirus canin de type 2.

8) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

15 a) une molécule d'acide nucléique représentant le génome d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et

20 b) une molécule d'acide nucléique constituée par un fragment de la molécule a) ci-dessus, comprenant entre 10 et 1000 pb, de préférence au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus répliquatif d'origine située en amont de la portion délétée et entre 10 et 5000 pb, de préférence entre 10 et 1000 pb, de manière préférée au moins 300 pb, de la séquence de l'adénovirus répliquatif d'origine située en aval
25 de la portion délétée.

9) Plasmide, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique selon la revendication 8.

30 10) Adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour une utilisation comme médicament.

11) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné à la thérapie génique.

35 12) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

13) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'une composition immunogène ou vaccinale.

14) Utilisation selon l'une quelconque des 5 revendications 11 à 13, caractérisée en ce que ledit médicament ou ladite composition sont destinés à être administrés chez l'animal, en particulier un carnivore domestique ou sauvage.

15) Utilisation selon l'une quelconque des 10 revendications 11 à 13, caractérisée en ce que ledit médicament ou ladite composition sont destinés à être administrés chez l'homme.

16) Procédé de préparation d'un adénovirus recombinant par recombinaison intermoléculaire homologue dans 15 une cellule procaryote, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

α) introduction dans ladite cellule procaryote :

(i) d'un plasmide comprenant le génome d'un adénovirus et un premier gène de sélection ; et (ii) d'un fragment d'ADN 20 préalablement linéarisé comprenant une séquence hétérologue flanquée de séquences homologues à celles flanquant le site dudit plasmide où doit s'effectuer l'insertion, et incluant un second gène de sélection, différent du premier,

β) culture de ladite cellule procaryote dans des 25 conditions sélectives, afin de permettre la génération et la sélection de cellules contenant des plasmides recombinants exprimant le premier et le second gène de sélection, et

γ) isolement du génome dudit adénovirus recombinant à partir des cellules procaryotes sélectionnées.

17) Procédé selon la revendication 16, 30 caractérisé en ce que le plasmide utilisé à l'étape α) est sous forme circulaire.

18) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le plasmide utilisé à l'étape α) est 35 préalablement linéarisé par clivage au niveau d'un site de restriction situé à l'extérieur du site d'insertion.

19) Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que ledit second

gène de sélection est entouré de 2 sites de restriction, identiques ou différents, absents dans le génome de l'adénovirus inclus dans le plasmide utilisé à l'étape α).

5 20) Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend une étape additionnelle de transfection dudit génome recombinant dans une lignée cellulaire permettant l'amplification dudit génomes et son encapsidation dans des particules virales infectieuses.

10 21°) Utilisation d'un adénovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la production de protéines recombinantes.

1/6

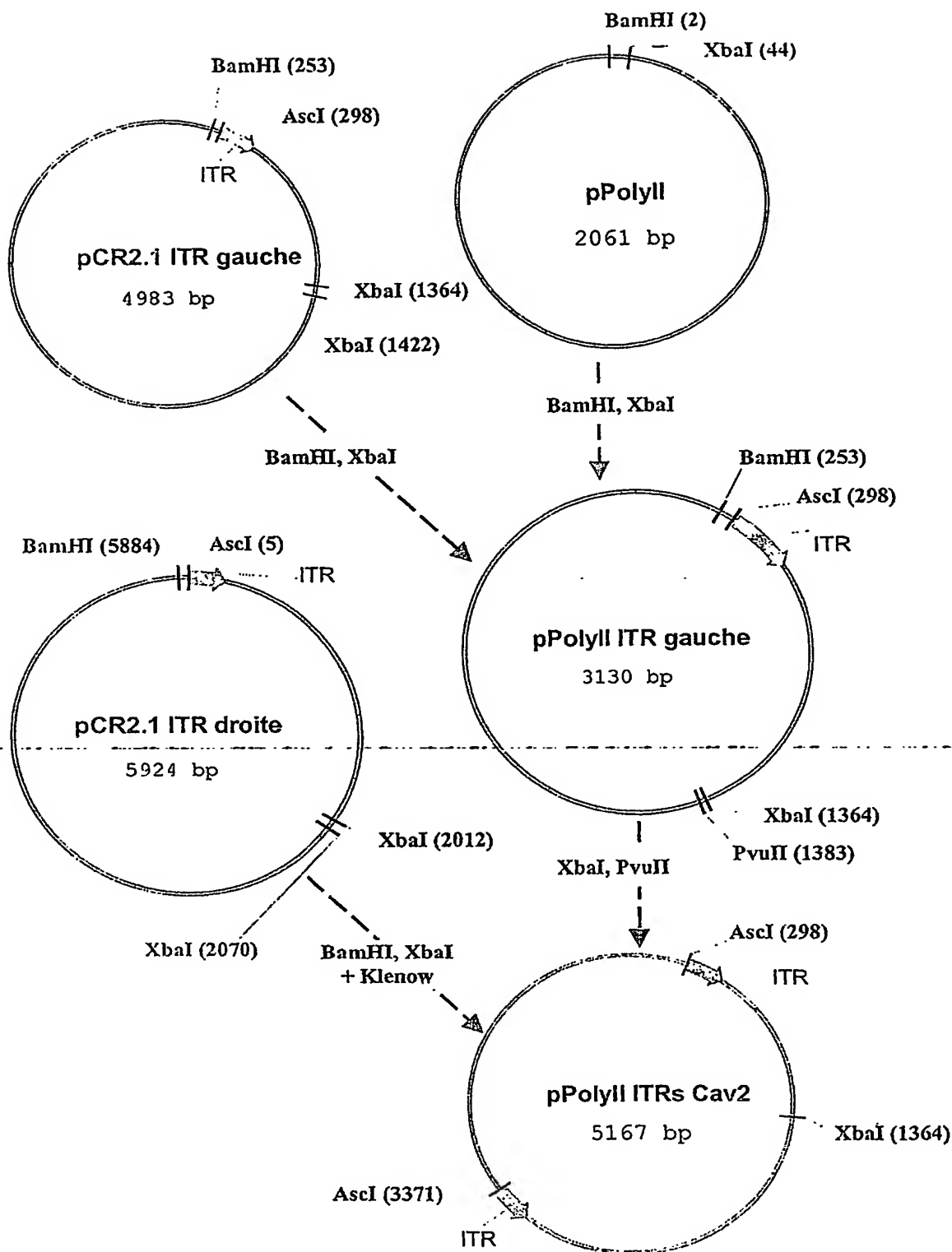


Figure 1

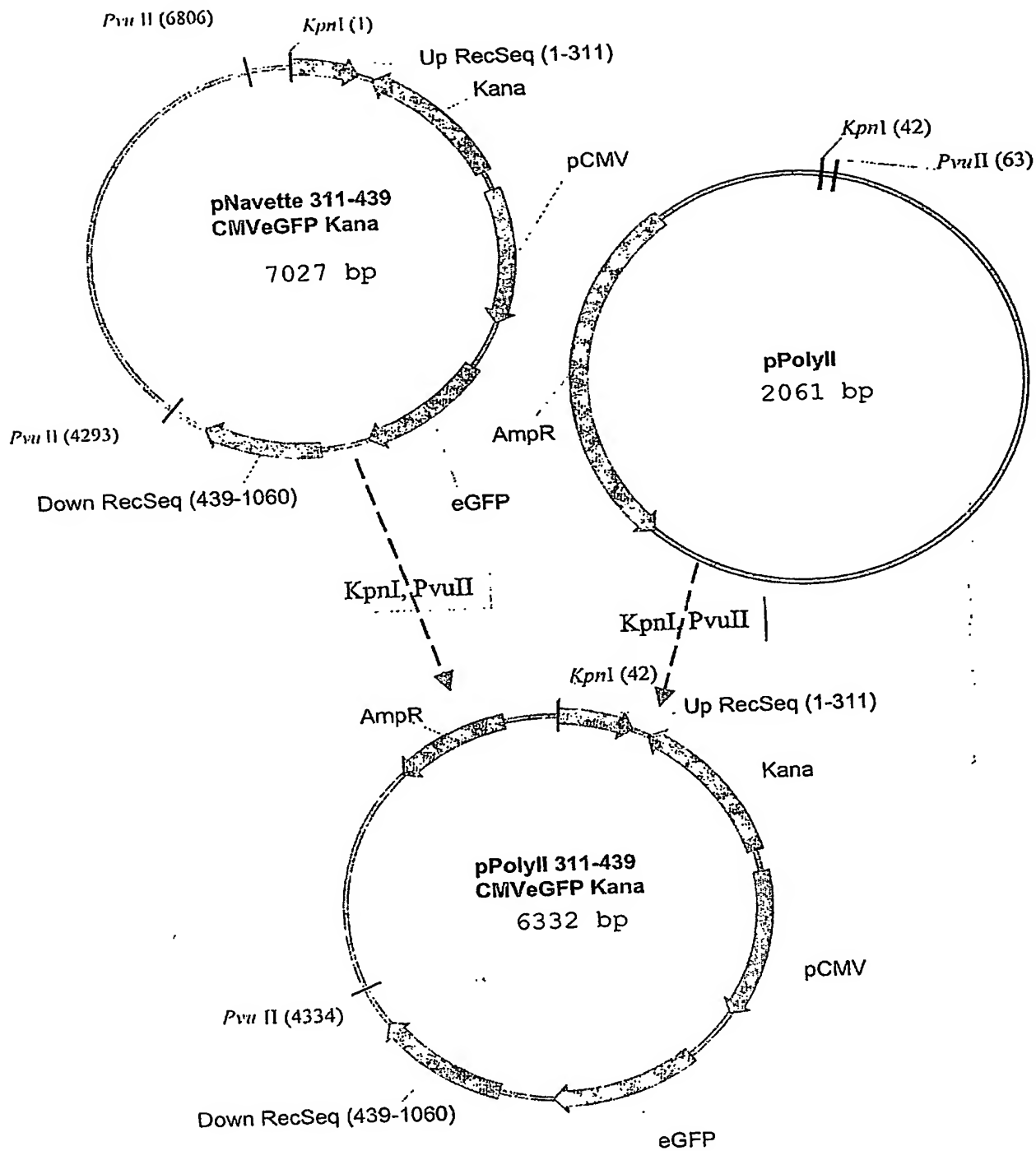


Figure 2

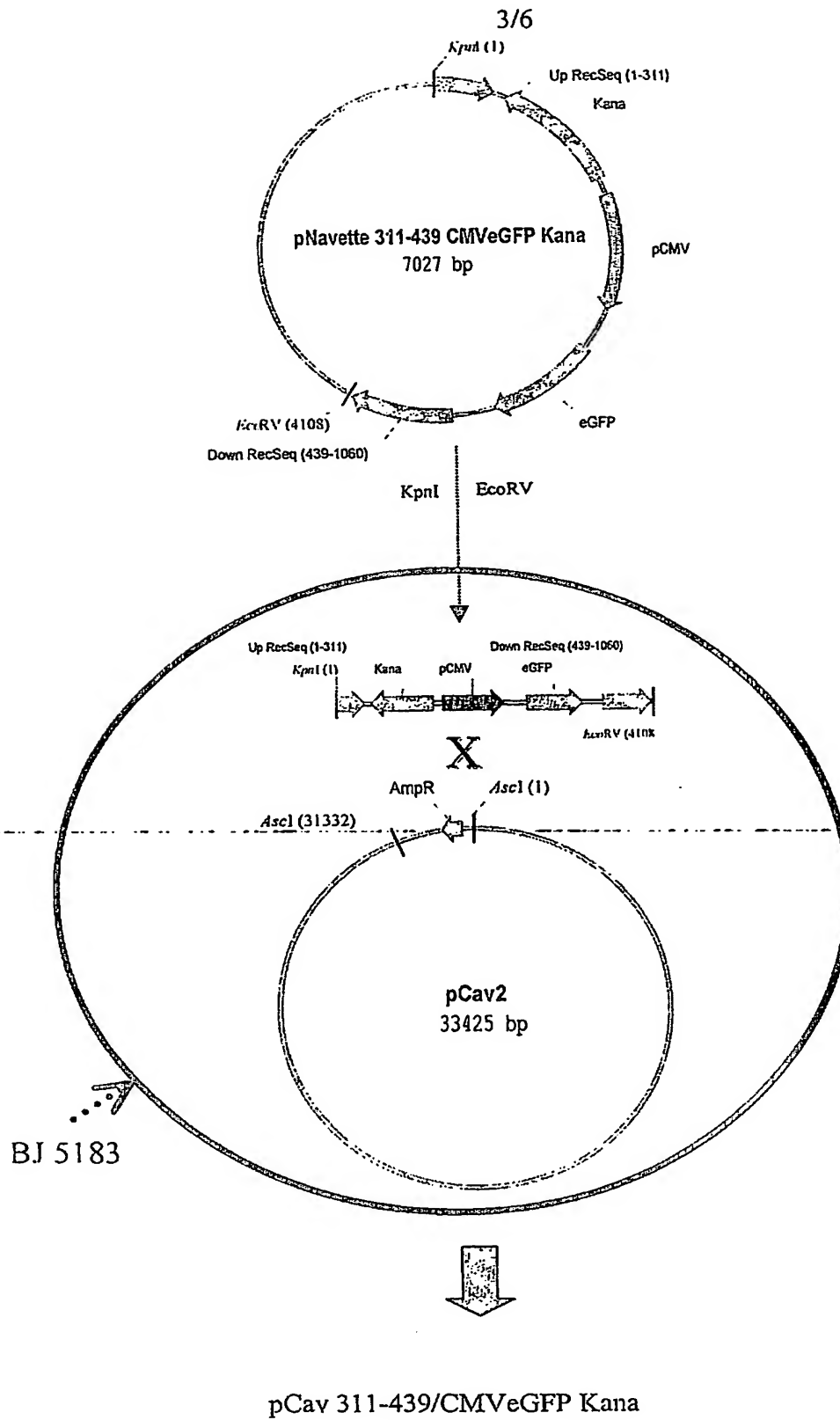
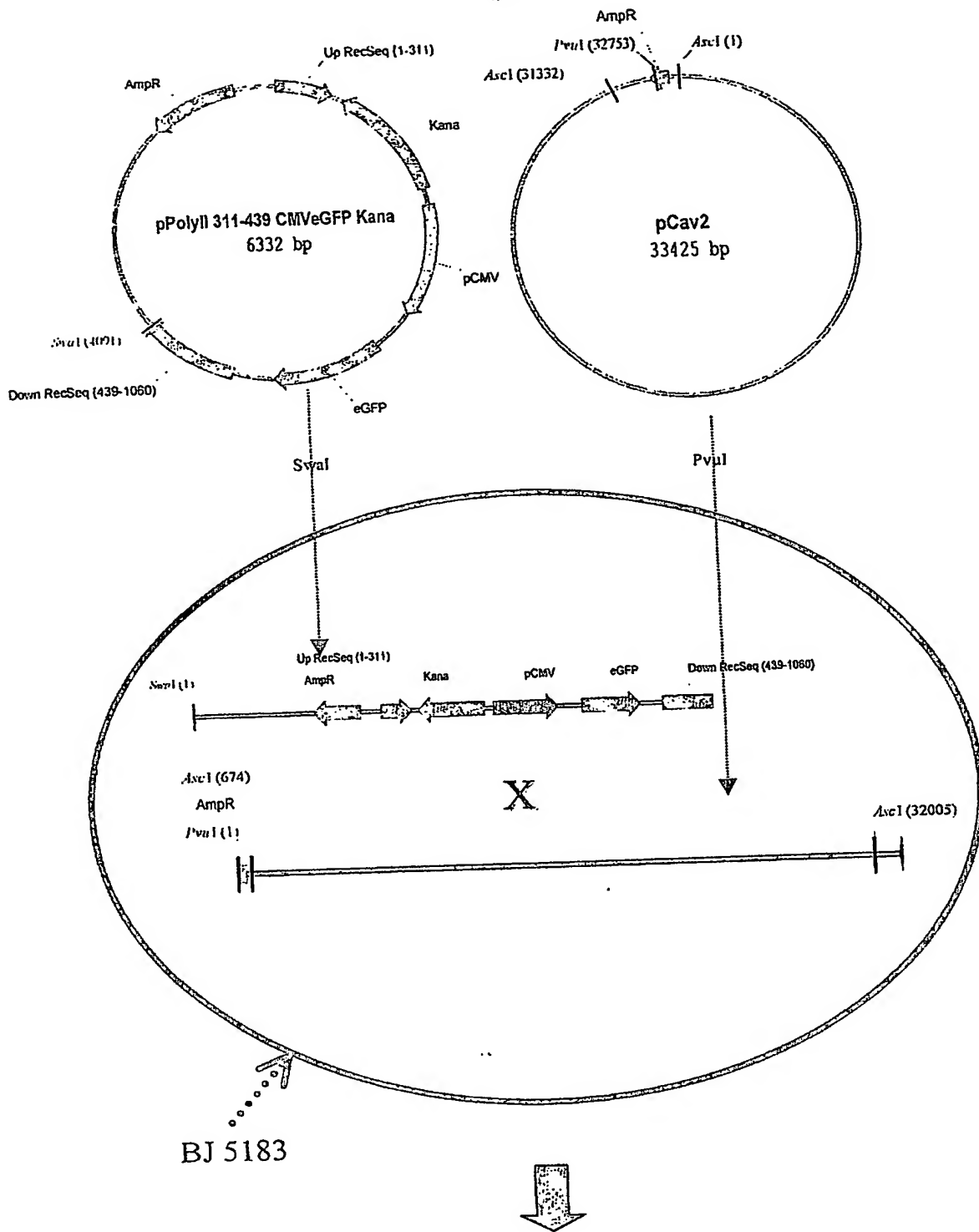


Figure 3

4/6



pCav 311-439/CMVeGFP Kana

Figure 4

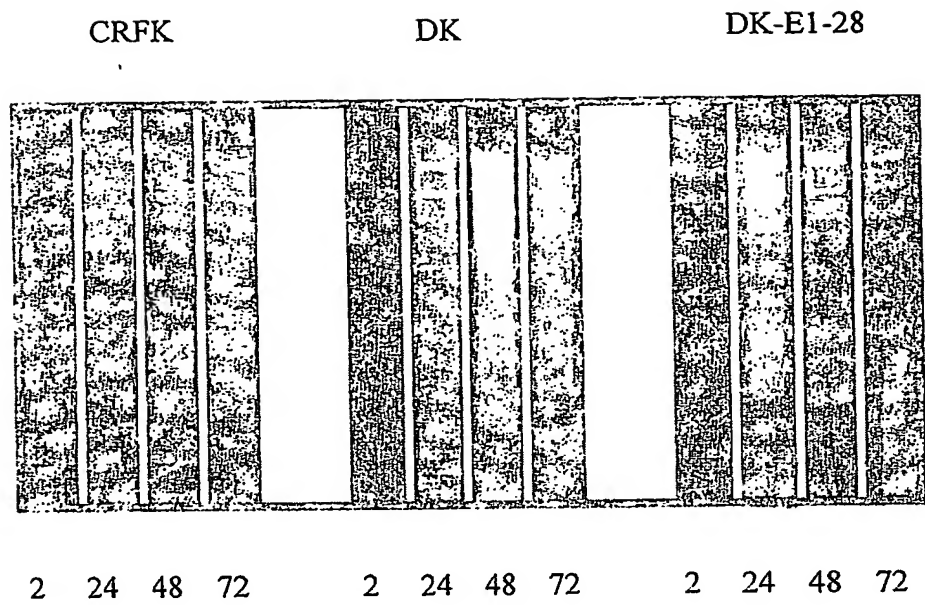


Figure 5

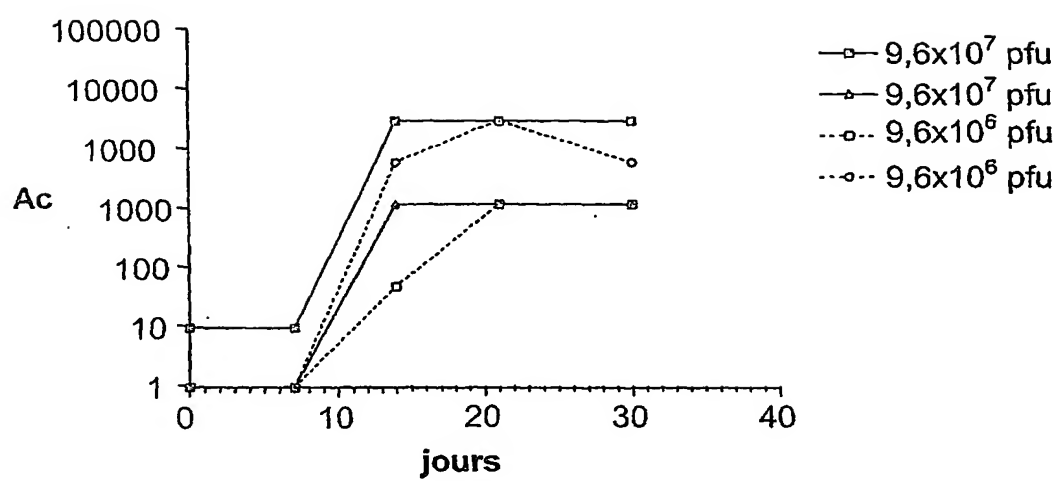


Figure 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> INRA
 ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT

<120> Vecteurs adénoviraux recombinants et leurs applications

<130> MJFbv539/109FR

<140>
 <141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 1
 ttggcgcgcc catcatcaat aatatacagg ac 32

<210> 2
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2
 gctctagacc tgcccaaaca tttaacc 27

<210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3
 gctctagagg gtgattatta acaacgtc 28

<210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4
ccgacgtcga ccataaactt tgacattagc cg

32

<210> 5
<211> 38
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5
gtctatagagc gaagatctcc aacagcaata cactcttg

38

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 6
gataaggatc acgcggcctt aaattctcag

30

<210> 7
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 7
gataaggatcaacagaaacactctgttctctg

32

<210> 8
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8
agctttgttt aaacggcgcg ccgggatttt ggatcatgaac

40

<210> 9
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9
ccggcgcgcc gtttaaaca agctatccgc tcatgaa

37

<210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 10
cggcgcgac ttgagtgcgc agcgaga

27

<210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 11
ggcgcgccga gagacaacgc tggacacgg

29

reçue le 29/01/03



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 2 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv539/109FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0219472
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) VECTEURS ADENOVIRAUX RECOMBINANTS ET LEURS APPLICATIONS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) 147, rue de l'Université 75007 PARIS ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT 7, avenue du Générale de Gaulle 94704 MAISONS-ALFORT Cedex DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	ELOIT
	Prénoms	Marc
Adresse	Rue	49, avenue Joffre
	Code postal et ville	9 4 1 0 0 SAINT-MAUR-DES-FOSSES
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	KLONJKOWSKI
	Prénoms	Bernard
Adresse	Rue	7, allée Raymond Nègre
	Code postal et ville	9 4 3 4 0 JOINVILLE-LE-PONT
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 8 octobre 2002 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PCT Application
FR0302964

